

# M5 HiPer Complex Plant microRNA Extraction Kit

## 多糖多酚植物 microRNA 提取试剂盒

### 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Complex Plant microRNA Extraction Kit	50T	MF940-01

#### 【储存条件】

本试剂盒室温保存，储存 6 个月不影响使用效果。所有溶液应是澄清的，如果环境温度低时可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37°C 水浴加热几分钟可恢复澄清。Wash Solution 2/3 可能加入乙醇使用几天后出现沉淀晶体，吸上清使用就可以，不影响使用。避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

#### 【产品简介】

传统的 microRNA 提取试剂盒均是采用异硫氰酸胍/苯酚/氯仿 (TRIzol 法) 加高浓度乙醇硅胶膜吸附小片段 microRNA 的原理方法制成，但是复杂的植物品类如棉花、葡萄、胡杨、冬青、月季、石斛、单参、水稻种子、人参、玉米胚芽等大量样品用 TRIzol 的原理甚至无法提取符合要求的总 RNA，更不用说 microRNA。因此包括 Qiagen, Invitrogen 等世界著名公司采用 TRIzol 法原理的 microRNA 提取试剂盒面临复杂植物样品时束手无策，产品线中干脆就没有复杂植物 microRNA 提取试剂盒。用户万般无奈只好用传统方法，或者 TRIzol 法提取，用异丙醇/乙醇沉淀方法来提取 microRNA，虽然也能提取到部分 microRNA，但是沉淀法损失巨大或者和杂质共沉淀，影响实验结果，在国际刊物投稿时常常面临质疑，甚至论文被撤销。而本试剂盒在公司全球领先数百种复杂植物提取的经验基础上（包括人参、雪莲、棉花、胡杨、冬青等各种复杂植物，并获得发明专利授权），创新性的采用了不用苯酚，氯仿的技术路线全球首家解决该问题，可以提取绝大多数复杂植物如棉花、杨树、冬青、月季、丹参等植物 microRNA，当然本试剂盒也适用于拟南芥、水稻、小麦、烟草、水稻等各种简单样品。

独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，植物 RNA 助提剂 PLANTaid 帮助结合多糖多酚并通过离心去除，然后裂解混合物通过基因组 DNA 清除柱，基因组 DNA 被清除而 RNA（包括 microRNA）被选择性滤过。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列特殊漂洗液快速的漂洗—离心的步骤，将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free H2O 将纯净 RNA（包括 microRNA）从硅基质膜上洗脱。采用分提取操作步骤也可单独纯化富集后的 microRNA 组分和总 RNA (>200 nt) 从而得到分离富集的 microRNA 和 RNA。

#### 【产品特色】

1. 完全不使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
3. 独有的植物 RNA 助提剂可以有效结合多糖多酚，提高清除效果。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD260/OD280 典型的比值达 2.0~2.2，可用于 RT-PCR, Northern-blot 和各种实验。

#### 【产品组份】

	50T	注意事项
裂解液 RLT Plus	50ml	室温保存
PLANTaid	5ml	室温保存
Wash Solution 1	12ml	第一次使用前加入 28ml 无水乙醇
Wash Solution 2/3	10ml	第一次使用前加入 42ml 无水乙醇
RNase-Free H <sub>2</sub> O	10ml	室温密闭干燥保存
基因组 DNA 清除柱和收集管	50 套	室温密闭干燥保存
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	50 套	室温密闭干燥保存

#### 【注意事项】

1. 所有的离心步骤均可在室温完成 (4°C 离心也可以)，使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 需要自备乙醇，β-巯基乙醇，研钵(可选)。
3. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱 DA 和 RNA 吸附柱 RA 处理能力，否则造成 DNA 残留或产量降低。开始摸索实验条件时，如果不清楚样品 DNA/RNA 含量时可使用较少的样品处理量，将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。

- 裂解液 RLTPlus 和 Wash Solution 1 中含有刺激性化合物, 操作时戴乳胶手套, 避免沾染皮肤, 眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时, 要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- 关于 DNA 的微量残留: 一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留(DNase 消化也无法做到 100% 无残留), 该产品由于采取了本公司独特的缓冲体系和基因组 DNA 清除柱技术, 绝大多数 DNA 已经被清除, 个别特殊情况需要清除微量基因组 DNA 残留, 可使用以下几种 DNA 酶消化的方式。
  - 传统 DNA 酶消化提取的 RNA/microRNA, 热灭活 DNA 酶后直接用于后续实验。
  - 传统 DNA 酶消化提取的 RNA/microRNA, 然后使用 RNA 清洁纯化试剂盒 (但是需要将说明书改动一个地方, 第二步加入 250 $\mu$ l 无水乙醇改成加入 700 $\mu$ l 无水乙醇) 清洁纯化后用于后续实验。
  - 直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 柱上消化处理。
- 碰到特别复杂多糖多酚, 淀粉等次级代谢产物特别丰富的样品, 如葡萄果实, 水稻种子, 裂解液 RLTPlus 效果不佳的情况下, 应该购买专用裂解液 CLB。裂解液 CLB 是本公司为特别复杂的多糖多酚植物样品研发的最强配方, 绝大部分裂解液 RLTPlus 无法提取的复杂样品都可以提取成功。见附录 3。

## 【操作步骤 (实验前请先阅读注意事项)】

提示: **第一次使用前请先在 Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 瓶加入指定量无水乙醇!**

对于 RNA 酶或者多酚特别丰富植物组织: 操作前在裂解液 RLTPlus 中加入 $\beta$ -巯基乙醇至终浓度 1%, 如 1 ml RLTPlus 中加入 10 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLTPlus 4 $^{\circ}$ C 可放置一个月。

1. 直接研磨法 (提取简单植物样品推荐此法, 但是简单样品也可以用液氮研磨法):

a. 新鲜植物组织称重后取 100-200mg 迅速剪成小块放入研钵 (冰冻保存或者液氮保存样品可直接称重后取 100-200mg 放入研钵), 加入 10 体积 (1ml) RLT Plus 和 1 体积 (100 $\mu$ l) PLANTaid 室温下充分研磨成匀浆, 注意应该迅速研磨让组织和裂解液 RLTPlus 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

**注: PLANTaid 是提取多糖多酚次级代谢产物色素含量丰富的困难样品不可缺少成分。**

b. 将裂解物转入离心管, 剧烈摇晃振荡 15 秒, 13, 000rpm 离心 5-10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTaid。

c. 取 480  $\mu$ l 裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量, 如残留基因组 DNA 较多, 可适当减少取上清量) 将裂解物上清加到 DNA 清除柱上 (清除柱放在收集管内)。

d. 立刻接操作步骤的步骤 3。

2. 液氮研磨法 (提取复杂, 易降解样品时推荐此法):

a. 取 500 $\mu$ l 裂解液 RLTPlus, 转入 1.5ml 离心管中, 加 50 $\mu$ l PLANTaid 混匀备用。

b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后, 取 50-100mg 细粉转入上述装有 RLTPlus 和 PLANTaid 的离心管, 立即用手剧烈振荡 20 秒, 充分裂解。

c. 用吸头吹打混匀帮助裂解或剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果 (或者电动匀 30 秒), 可以剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。

d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 5-10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTaid。

e. 取裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量) 将裂解物上清加到 DNA 清除柱上 (清除柱放在收集管内)。

f. 立刻接操作步骤的步骤 3。

**注意: 以上液氮研磨法用户可以根据需要加倍处理, 可以提高产量。也就是使用 1ml 的裂解液 RLT Plus 和 100 $\mu$ l PLANTaid 和 100-200mg 的样品。**

3. 立即 13,000 rpm 离心 60 秒, 收集滤液 (RNA 在滤液中)。

4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积 (480 $\mu$ l 左右, 滤过时候损失体积应该减去), 加入 1.25 倍体积的无水乙醇, 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。

5. 立刻将混合物 (每次小于 700 $\mu$ l, 多可以分两次加入) 加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。确保离心后液体全部滤过去, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间。

- 6.加 700µl Wash Solution 1 (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
- 7.加入 500µl Wash Solution 2/3 (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。加入 500µl Wash Solution 2/3, 重复一遍。
- 8.将吸附柱 RA 放回空收集管中, 13,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
- 9.取出吸附柱 RA, 放入一个 RNase free 离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50µl RNase free water, 室温放置 1 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。将洗脱液加回到吸附柱重复洗脱步骤一遍可以提高产量约 10-15%。
- 10.得到的 RNA/microRNA 可以立即用于下游反应或者尽快置于低温保存。

#### 附录 1: microRNA 富集方法 (microRNA/去除了 microRNA 的总 RNA 分别提取)

提示: **第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶加入指定量无水乙醇!**

对于 RNA 酶或者多酚特别丰富植物组织: 操作前在裂解液 RLTPlus 中加入β-巯基乙醇至终浓度 1%, 如 1 ml RLTPlus 中加入 10µl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLTPlus 4℃可放置一个月。

1. 直接研磨法 (提取简单植物样品推荐此法, 但是简单样品也可以用液氮研磨法):

- a. 新鲜植物组织称重后取 100mg 迅速剪成小块放入研钵 (冰冻保存或者液氮保存样品可直接称重后取 100mg 放入研钵), 加入 10 体积 (1ml) RLT Plus 和 1 体积 (100µl) PLANTaid 室温下充分研磨成匀浆, 注意应该迅速研磨让组织和裂解液 RLT 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

**注: PLANTaid 是提取多糖多酚次级代谢产物色素含量丰富的困难样品不可缺少成分。**

- b.将裂解物转入离心管, 剧烈摇晃振荡 15 秒, 13, 000rpm 离心 5-10 分钟,沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTaid。
- c.取 480µl 裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量, 如残留基因组 DNA 较多, 可适当减少取上清量) 转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(0.5 体积), 此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程, 立即吹打混匀,不要离心。
- d.立刻接富集方法的步骤 3。

2.液氮研磨法 (提取复杂, 易降解样品时推荐此法):

- a.取 500µl 裂解液 RLTPlus, 转入 1.5ml 离心管中, 加 50µl PLANTaid 混匀备用。
- b.液氮中研磨适量植物组织成细粉后, 取 50mg 细粉转入上述装有 RLTPlus 和 PLANTaid 的离心管, 立即用手剧烈振荡 20 秒, 充分裂解。
- c.用吸头吹打混匀帮助裂解或者剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒), 可以剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。
- d.将裂解物 13,000 rpm 离心 5-10 分钟, 沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTaid。
- e.取裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清, 这样可以提高产量) 转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(0.5 体积), 此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程, 立即吹打混匀,不要离心。
- f.立刻接富集方法的步骤 3。

**注意: 以上液氮研磨法用户可以根据需要加倍处理, 可以提高产量。也就是使用 1ml 的裂解液 RLT Plus 和 100µl PLANTaid 和 100mg 的样品。**

- 3.将混合物(每次小于 720µl, 多可以分两次加入)加入一个基因组清除柱中, (清除柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 2 分钟, 保留滤液 (microRNA 在滤液中)。此时, 滤过液含有 microRNA, 基因组 DNA 清除柱子上面是去除了 microRNA 的总 RNA (不包含 microRNA), 如果需要, 可以按照前面标准操作步骤 6—10 操作漂洗, 洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。
- 4.用微量移液器较精确估计滤过液体积, 加入 0.65 倍体积无水乙醇 (必须是室温的), 涡旋或者吹打充分混匀, 不要离心。

5.立刻将混合物(每次小于 700µl, 多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 2 分钟,

弃掉废液。确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。

6.按照前面标准操作步骤 6—10 操作漂洗，洗脱得到富集的 microRNA。

**注意：**不同的实验可以选择不同的方法，例如 Northern Blot 或者表达芯片谱分析可以选择提取包括 microRNA 的总 RNA。富集方法提取的 microRNA 因为去除了较大片段的 mRNA 和 rRNA 等，可能减少某些下游试验的扩增背景，当背景较高或者非特异扩增较多时，可以尝试使用富集方法提取的 microRNA。

## 附录 2：DNA 酶柱上消化

- 1.按照前面所列操作步骤操作，直到做完操作步骤 5。
- 2.取 45 $\mu$ l DNase I buffer 和 5 $\mu$ l RNase free DNase I 在离心管轻轻吹打混匀成工作液（处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液）。
- 3.向吸附柱 RA 中加入 350 $\mu$ l Wash Solution 1，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
- 4.向吸附柱 RA 中央加入 50 $\mu$ l 的 DNase I 工作液，室温（20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C）放置 15 分钟。注意直接将工作液滴在膜中央上向膜四周浸润充分和膜接触，不要让工作液滴在 O 型垫圈或是离心柱管壁上挂壁或者挂在垫圈上不能充分和膜接触。
- 5.向吸附柱 RA 中加入 350  $\mu$ l Wash Solution 1，12,000 rpm 离心 30-60 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
- 6.接操作步骤 7 完成后续步骤。

## 附录 3：植物 microRNA 快速提取试剂盒使用裂解液 CLB 操作步骤

### 第一次使用前请先在 Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 瓶加入指定量无水乙醇!

取 1ml 裂解液 CLB 至离心管内(如果 CLB 有析出或者沉淀需先置于 65 $^{\circ}$  C 水浴重新溶解)，在裂解液 CLB 中加入 5% $\beta$ -巯基乙醇（1ml CLB 加 50 $\mu$ l $\beta$ -巯基乙醇）。颠倒混匀后 65 $^{\circ}$  C 水浴中预热。

1. 液氮中研磨新鲜或-70 $^{\circ}$  C 冷冻的材料至细粉。
2. 转移 100-150mg 细粉（水分少的样品如种子叶片等可加 100mg，水分多的样品如西瓜可多加一些）加至预热的裂解液 CLB（已加有 $\beta$ -巯基乙醇）离心管中，立即激烈涡旋 30—60 秒或者用吸头吹打混匀裂解，短时放回 65 $^{\circ}$  C 水浴中（5 min-10min，时间稍长一点 10 分钟产量可能提高一些），中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。 $\beta$ -巯基乙醇是裂解液 CLB 的关键成分，必要的时候可以提提高终浓度到 10-20%。
3. 振荡混匀后室温 13,000rpm 离心 10 分钟。
4. 取裂解物上清（在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下可以取更多的上清，这样可以提高产量）转到一个新离心管。若上清表面有漂浮物，用吸头挑开吸取下面液体即可。
5. 立刻接后续操作步骤。

### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。